

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/85, 15/86, C07K 14/775		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/21349 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1998 (22.05.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01992 (22) Date de dépôt international: 6 novembre 1997 (06.11.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/13691 8 novembre 1996 (08.11.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAHFOUDI, Abderahim [FR/FR]; 42, rue des Pastoureaux, F-94440 Marolles en Brie (FR). BENOIT, Patrick [FR/FR]; 24, rue Jonquay, F-75014 Paris (FR). BRANELLEC, Didier [FR/FR]; 39, avenue de Sébastopol, F-94210 La Varenne Saint-Hilaire (FR). DENEFLÉ, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés de Chateaubriand, F-94100 Saint Maur (FR). DUVERGER, Nicolas [FR/FR]; 1, rue Martel, F-75010 Paris (FR). BERTHOU, Laurence [FR/FR]; 5, allée du Parc de Choisy, F-75013 Paris (FR). AUWERX, Johan [FR/FR]; 60, route de Hasnon, F-59178 Millongosse (FR). STAEELS, Bart [BE/BE]; 41, rue J. Wautiers, B-7972 Quevaucamps (BE).		(74) Mandataire: DERNONCOUR, Roxane; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR). (81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: NOVEL CONSTRUCTS AND VECTORS FOR THE TARGETED AND INDUCIBLE EXPRESSION OF GENES (54) Titre: NOUVELLES CONSTRUCTIONS ET VECTEURS POUR L'EXPRESSION CIBLÉE ET INDUCTIBLE DE GENES (57) Abstract <p>The invention concerns novel constructs and novel vectors for the targeted and inducible expression of genes. It describes in particular novel hybrid promoters and their use for the expression of genes in hepatic cells, in vitro, ex vivo or in vivo.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne de nouvelles constructions et de nouveaux vecteurs permettant une expression ciblée et inductible de gènes. Elle décrit en particulier de nouveaux promoteurs hybrides et leur utilisation pour l'expression de gènes dans les cellules hépatiques, in vitro, ex vivo ou in vivo.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

NOUVELLES CONSTRUCTIONS ET VECTEURS POUR L'EXPRESSION
CIBLEE ET INDUCTIBLE DE GENES

La présente invention concerne le domaine de la biologie, et en particulier le domaine de la régulation de l'expression de gènes. Elle décrit
5 notamment de nouvelles constructions et de nouveaux vecteurs permettant une expression ciblée et inductible de gènes. La présente invention est utilisable dans de nombreux domaines, et en particulier pour la production de protéines recombinantes, pour la création de modèles animaux transgéniques, pour la création de lignées cellulaires, pour la mise au point
10 de tests de criblage, ou encore en thérapie génique et cellulaire.

La possibilité de contrôler et de diriger l'expression de gènes constitue un enjeu très important dans le développement des biotechnologies. In vitro, elle permet d'améliorer les conditions de production de protéines recombinantes, en découplant par exemple la phase de
15 croissance cellulaire et la phase de production. Toujours in vitro, elle permet encore de créer des lignées cellulaires capables de produire certaines molécules à des périodes choisies. Ainsi, il est envisageable de construire des lignées cellulaires produisant, de manière régulée, des protéines transcomplementant des génomes viraux défectifs. Toujours in vitro, un
20 système d'expression régulé permet la mise au point de tests de criblages de molécules agissant sur le contrôle de l'expression de gènes. Le contrôle de l'expression de gènes est également très important pour des approches thérapeutiques ex vivo ou in vivo, dans lesquelles la possibilité de contrôler sélectivement la production d'une molécule thérapeutique est essentielle. En
25 effet, selon les applications, selon le gène à transférer, il est important de pouvoir cibler certains tissus ou certaines parties seulement d'un organisme afin de concentrer l'effet thérapeutique et de limiter la dissémination et les effets secondaires.

Ce ciblage peut être réalisé en utilisant des vecteurs présentant une
30 spécificité cellulaire donnée. Une autre approche consiste à utiliser des signaux d'expression spécifiques de certains types cellulaires. A cet égard, des promoteurs dits spécifiques ont été décrits dans la littérature, tels que le promoteur des gènes codant pour la pyruvate kinase, la villine, la GFAP, le promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras. le promoteur

de l'actine α des cellules du muscle lisse, ou le promoteur du gène de l'albumine humaine par exemple. Cependant, si ces promoteurs présentent une certaine spécificité tissulaire, ils ne sont pas régulables et de ce fait, offrent des possibilités de contrôle limitées. D'autres systèmes, plus complexes, ont été décrits dans la littérature. Ainsi, la demande WO96/01313 décrit un système d'expression de gènes régulé par la tétracycline. De même, Wang et al. (PNAS 91 (1994) 8180) ont décrit un système d'expression de gènes régulé par le RU486. Evans et al. ont quant à eux décrit un système basé sur le récepteur à l'ecdysone, hormone d'insecte (PNAS 93 (1996) 3346). Cependant, ces différents systèmes, bien qu'inductibles, ne présentent pas de spécificité tissulaire. De ce fait, ils ne permettent pas à eux seuls de cibler l'expression au niveau d'organes ou de tissus désirés, mais simplement d'induire ou de réprimer l'expression de manière ubiquitaire. De plus, le système tétracycline présente un niveau de régulation relativement faible, inférieur à un facteur cinq. Par ailleurs, ces systèmes fonctionnent avec des molécules hybrides et nécessitent la cotransfection de 2 constructions au moins. En outre, ils mettent en oeuvre des éléments hétérologues et risquent donc de générer des réactions immunitaires.

L'invention décrit maintenant de nouvelles constructions permettant l'expression ciblée et régulée de gènes. L'invention décrit en particulier des vecteurs recombinants permettant une expression de gènes inductible et hépatospécifique. L'invention décrit également de nouvelles constructions promotrices ayant des niveaux de régulation améliorés. La présente invention offre ainsi un moyen particulièrement performant pour le ciblage de l'expression de gènes dans des cellules hépatiques, in vivo ou in vitro, et pour la régulation de cette expression.

La présente demande repose en particulier sur l'utilisation du promoteur du gène humain de l'apolipoprotéine AII. L'apolipoprotéine AII (apoAII) est l'un des constituants protéiques majeurs des lipoprotéines de hautes densité (HDL). L'apoAII est synthétisée majoritairement dans le foie, bien que des résultats contradictoires suggèrent une synthèse également au niveau de l'intestin. Le gène humain de l'apoAII a été cloné et séquencé (Tsao et al., J.Biol.Chem 260 (1985) 15222). La région promotrice s'étend sur

- environ 1 kb en amont du codon d'initiation de la transcription. Elle comporte des éléments régulateurs localisés au niveau des nucléotides -903 à -680, ainsi que des sites multiples additionnels situés au niveau de la région intermédiaire (nucléotides -573 à -255) et proximale (-126 à -33).
- 5 L'expression optimale est obtenue lorsque des facteurs nucléaires sont liés aux éléments régulateurs proximaux et distaux du promoteur.

La séquence du promoteur du gène humain de l'apoAII, du résidu - 911 à +29 est représentée sur la séquence SEQ ID n° 1.

- Il a été observé des mécanismes de régulation du promoteur apoAII
- 10 contradictoires chez l'homme et chez les rongeurs. Dans un cas, une stimulation par les fibrates a été observée, dans l'autre, une inhibition. Les fibrates, souvent utilisés comme agents hypolipidémiques, appartiennent à la famille chimique des proliférateurs de peroxisome, dans la mesure où ils induisent une hépatomegalie liée à la prolifération des peroxisomes chez les
- 15 rongeurs. Leur action est médiée par des récepteurs activés (PPAR : "Peroxisome Proliferator Activated Receptor"), un groupe de 4 récepteurs nucléaires distincts (α , β , γ , δ). Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires qui se lient à des éléments de réponse spécifiques désignés PPRE ("Peroxisome Proliferator Response Element").
- 20 Des PPRE ont été identifiés dans de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de β -oxydation, qui se sont avérés être inductibles par les fibrates.

- La demanderesse a maintenant mis au point un système d'expression de gènes hépatospécifique et inductible par les fibrates,
- 25 utilisables in vitro et in vivo. Plus particulièrement, la demanderesse a construit pour la première fois un vecteur ayant un tropisme pour le foie permettant l'expression de gènes de manière sélective dans le foie ou les cellules hépatiques, et de manière inductible par les fibrates. La demanderesse a également construit de nouveaux promoteurs dérivés du
- 30 promoteur du gène de l'apoAII humain, ayant des propriétés d'inductibilité et de force améliorées.

Un premier objet de l'invention réside dans un vecteur recombinant pour l'expression inductible et hépatospécifique d'une molécule caractérisée

en ce qu'il comprend, une cassette d'expression constituée d'un acide nucléique codant pour ladite molécule placé sous contrôle du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain.

5 Selon une variante particulièrement préférée le vecteur recombinant est un vecteur viral dérivé des adénovirus, comprenant, inséré dans son génome, ladite cassette d'expression.

De manière particulièrement remarquable, la demanderesse a en effet montré qu'un tel adénovirus permettait d'exprimer un gène spécifiquement dans le foie, que cette expression était fortement inductible in vivo par les fibrates, et que les niveaux d'expression obtenus étaient comparables à ceux décrits antérieurement avec les promoteurs constitutifs les plus forts.

10

Le caractère hépatosécifique des virus de l'invention signifie que ces virus permettent l'expression d'un gène de manière très sélective dans les cellules hépatiques, in vitro, ex vivo ou in vivo. Une expression non-spécifique faible dans d'autres tissus ou types cellulaires peut être tolérée, dès lors qu'une expression très majoritaire est observée dans les cellules hépatiques (de préférence plus de 80% des cellules exprimant le transgène sont des cellules hépatiques. Encore plus préférentiellement, plus de 90%).

15

En particulier, contrairement aux indications contradictoires relevées dans l'art antérieur, le virus selon l'invention n'induit aucune expression détectable dans l'intestin et offre donc une sélectivité particulièrement élevée. Ceci est très important pour des approches de transfert et d'expression de gènes toxiques, pour lesquelles un niveau de sélectivité très élevé est nécessaire.

20

Par ailleurs, comme indiqué précédemment, les systèmes inductibles décrits dans l'art antérieur présentent une inductibilité moyenne, d'un facteur cinq environ. Les résultats présentés dans les exemples démontrent que l'adénovirus de l'invention est inductible d'un facteur dix environ. Le niveau d'inductibilité est également très important pour obtenir un contrôle de la

25

quantité de molécules délivrées in vivo. Ceci est particulièrement sensible dans le cas de molécules immunogènes ou susceptibles de générer des réponses inflammatoires. Ceci est également particulièrement intéressant pour l'expression de molécules dont l'efficacité biologique implique des concentrations élevées. D'autre part, une autre caractéristique

30

particulièrement remarquable du vecteur de l'invention réside dans les niveaux d'expression élevés obtenus. En effet, les systèmes inductibles présentent généralement en contrepartie, des niveaux d'expression moyens voire faibles. De manière surprenante et avantageuse, la demanderesse a
5 montré que le système de l'invention permet d'obtenir des niveaux d'expression in vivo comparables à ceux décrits pour les promoteurs constitutifs les plus forts. Le système de l'invention combine donc pour la première fois des propriétés remarquables de sélectivité, d'inductibilité, et de force.

10 L'un des aspects de l'invention réside donc dans l'utilisation du promoteur du gène humain de l'apoAII. Un autre aspect de l'invention réside dans la construction de vecteurs dérivés des adénovirus. Les vecteurs selon l'invention combinent des propriétés remarquables de transfert de gènes, d'inocuité, de spécificité tissulaire, d'inductibilité et de force.

15 Avantageusement, le promoteur utilisé dans les virus de l'invention comprend les éléments régulateurs du promoteur du gène de l'apoAII. Plus particulièrement, ces éléments sont localisés au niveau des nucléotides -903 à -680; -573 à -255; et -126 à -33 du gène humain de l'apoAII. A cet égard, selon une variante particulière, le promoteur comprend les résidus -911 à
20 +29 du gène de l'apoAII (séquence SEQ ID n° 1).

Il est entendu que des formes plus courtes ou plus longues du promoteur peuvent être utilisées. Ainsi, du côté 3', il est important que le promoteur comprenne le site d'initiation de la transcription du gène de l'apoAII (numéroté +1 sur SEQ ID n° 1). En revanche, il est préférable que ce
25 promoteur ne contienne pas le premier intron du gène de l'apoAII, qui commence au nucléotide +38. Ainsi, avantageusement, le fragment utilisé possède une extrémité 3' comprise entre les résidus +5 et +35, plus préférentiellement +10 et +30 du gène apoAII. Pour ce qui est de l'extrémité 5', il est préférable, pour obtenir des niveaux importants d'expression dans le
30 foie, de conserver au moins en partie le site de liaison des facteurs hépatiques. Ce site est localisé au niveau des nucléotides -903 à -680. De ce fait, avantageusement, le fragment utilisé possède une extrémité 5' localisée en amont du nucléotide -903. Cette extrémité peut être localisée par exemple dans la région -950 à -910. Par ailleurs, pour des raisons de capacité de

clonage, il est avantageux d'utiliser une région promotrice de taille réduite. De ce fait, on préfère utiliser un fragment dont l'extrémité 5' est localisée dans la région -925 à -910.

Selon une variante avantageuse de l'invention, le promoteur comporte les
5 éléments de régulation localisés au niveau des nucléotides -903 à -680 (ou -903 à -720) et -126 à -33, mais pas les éléments intermédiaires localisés au niveau des nucléotides -573 à -255. En particulier, le promoteur utilisé comprend avantageusement une délétion dans la région comprise entre les
10 résidus -710 et -150. A titre d'exemple spécifique, le promoteur peut être avantageusement constitué d'un variant de la séquence SEQ ID n° 1 obtenu par délétion des résidus 708-210. De manière encore plus préférentielle, le promoteur utilisé comprend une délétion dans la région comprise entre les résidus -670 et -210. A titre d'exemple spécifique, le promoteur peut être
15 avantageusement constitué d'un variant de la séquence SEQ ID n° 1 obtenu par délétion des résidus; 653-210.

Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que ce type de construction présente une force élevée et une inductibilité par les
20 fibrates supérieure au promoteur natif de l'apoAll, dans un contexte adénoviral. Ces constructions sont donc avantageuses sur le plan des propriétés régulatrices, comme sur le plan de la capacité de clonage du vecteur, puisque la région promotrice est réduite.

Selon un autre mode de réalisation, les adénovirus selon l'invention comprennent comme promoteur un variant du promoteur du gène de
25 l'apolipoprotéine All comprenant une répétition de motifs J. La multiplication de la région J permet de manière avantageuse d'augmenter également le caractère inductible par les fibrates du promoteur. La région J est constituée de la séquence TCAACCTTTACCCTGGTAG (SEQ ID n° 2, soulignée sur
30 SEQ ID n°1). Elle est localisée dans le promoteur All au niveau des nucléotides -734 à -716 du promoteur. La demanderesse a maintenant construit des virus recombinants comportant des promoteurs modifiés au niveau de la région J. Ces virus présentent des propriétés particulièrement
avantageuses pour le transfert et l'expression de gènes, in vitro comme in vivo.

Préférentiellement, le promoteur comprend de 2 à 5 motifs J. Encore plus préférentiellement, il comprend 3 motifs J. Pour la construction de ces variants, la répétition de motifs J peut être positionnée en 5' du promoteur, en 3' du promoteur, ou insérée dans la séquence du promoteur, de préférence
5 au niveau de la séquence J native. Par ailleurs, la multiplication de motifs J peut avantageusement être combinée avec une délétion telle que décrite ci-avant. Ceci permet d'obtenir un promoteur ayant des propriétés encore améliorées en terme de puissance et de contrôle de l'expression de gènes.

Ces différentes constructions peuvent être réalisées selon les
10 techniques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Ainsi, en partant de la séquence SEQ ID n° 1, l'homme du métier peut effectuer différentes délétions en sélectionnant des enzymes de restriction appropriées. Les délétions peuvent également être réalisées par mutagenèse dirigée ou par PCR. D'autre part, les régions J peuvent être synthétisées
15 artificiellement au moyen de synthétiseurs de nucléotides, puis insérées dans ou fusionnées au promoteur par PCR ou par clivage et ligation au moyen d'enzymes appropriées. Ces différentes approches sont illustrées dans les exemples.

Comme indiqué ci-avant, les capacités remarquables des vecteurs de
20 l'invention découlent du promoteur utilisé, comme du choix du vecteur. La mise en évidence de la fonctionnalité des promoteurs dans un contexte adénoviral in vivo a en effet permis la réalisation de ces vecteurs très performants.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille
25 de 36 (kilobases) kb environ. Il en existe différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, les adénovirus recombinants peuvent être d'origine humaine ou animale. Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés
30 dans le groupe C, en particulier les adénovirus de type 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) ou 12 (Ad12). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on peut citer préférentiellement les adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61

(ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Le génome des adénovirus comprend notamment une séquence
5 inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs. Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les
10 régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation comme vecteurs recombinants, différentes
15 constructions dérivées des adénovirus ont été préparées, incorporant différents gènes thérapeutiques. Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de répliquer dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la répliquer
20 virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Par ailleurs, pour améliorer les propriétés du vecteur, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite
25 dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de 72kDa de liaison à l'ADN (DBP) (Van der Vliet et al., 1975). D'autres vecteurs comprennent une deletion d'une autre région essentielle à la répliquer et/ou à la propagation virale, la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs,
30 dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la répliquer de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans

lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits. De tels vecteurs ont été décrits pas exemple dans les demandes WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378). En outre, des vecteurs portant une modification
5 au niveau du gène IVa2 ont également été décrits (WO96/10088).

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'adénovirus recombinant est un adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, il s'agit d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Avantageusement, l'adénovirus recombinant utilisé dans le cadre de
10 l'invention comprend une délétion dans la région E1 de son génome. Encore plus particulièrement, il comprend une délétion des régions E1a et E1b. A titre d'exemple précis, on peut citer des délétions affectant les nucléotides 454-3328; 382-3446 ou 357-4020 (par référence au génome de l'Ad5).

Selon une variante préférentielle, l'adénovirus recombinant utilisé
15 dans le cadre de l'invention comprend en outre une délétion dans la région E4 de son génome. Plus particulièrement, la délétion dans la région E4 affecte l'ensemble des phases ouvertes. On peut citer à titre d'exemple précis les délétions 33466-35535 ou 33093-35535. D'autres types de délétions dans la région E4 sont décrites dans les demandes WO95/02697 et
20 WO96/22378, incorporées à la présente par référence.

La cassette d'expression peut être insérée en différents sites du génome recombinant. Elle peut être insérée au niveau de la région E1, E3 ou E4, en remplacement des séquences délétées ou en surplus. Elle peut également être insérée en tout autre site, en dehors des séquences
25 nécessaires en cis à la production des virus (séquences ITR et séquence d'encapsidation).

Les adénovirus recombinants sont produits dans une lignée d'encapsidation, c'est-à-dire une lignée de cellules capables de compléter en trans une ou plusieurs des fonctions déficientes dans le
30 génome adénoviral recombinant. L'une de ces lignées est par exemple la lignée 293 dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 est une lignée de cellules

embryonnaires humaines de rein contenant l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a et E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2.

- 5 Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cette lignée est également capable de produire, à température permissive (32°C), des stocks de virus comportant en outre la mutation E2
- 10 thermosensible. D'autres lignées cellulaires capables de compléter la région E1 ont été décrites, basées notamment sur des cellules de carcinome de poumon humain A549 (WO94/28152) ou sur des rétinoblastes humains (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Par ailleurs, des lignées capables de trans-complémenter plusieurs fonctions de l'adénovirus ont également été décrites.
- 15 En particulier, on peut citer des lignées complémentant les régions E1 et E4 (Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559 ; Cancer Gen. Ther. 2 (1995) 322 ; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575) et des lignées complémentant les régions E1 et E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071).

- 20 Les adénovirus recombinants sont habituellement produits par introduction de l'ADN viral dans la lignée d'encapsidation, suivie d'une lyse des cellules après environ 2 ou 3 jours (la cinétique du cycle adénoviral étant de 24 à 36 heures). Pour la mise en oeuvre du procédé, l'ADN viral introduit peut être le génome viral recombinant complet, éventuellement construit
- 25 dans une bactérie (WO96/25506) ou dans une levure (WO95/03400), transfecté dans les cellules. Il peut également s'agir d'un virus recombinant utilisé pour infecter la lignée d'encapsidation. L'ADN viral peut aussi être introduit sous forme de fragments portant chacun une partie du génome viral recombinant et une zone d'homologie permettant, après introduction dans la
- 30 cellule d'encapsidation, de reconstituer le génome viral recombinant par recombinaison homologue entre les différents fragments.

Après la lyse des cellules, les particules virales recombinantes sont isolées par centrifugation en gradient de chlorure de césium. Une méthode alternative a été décrite dans la demande FR96:08164 incorporée à la présente par référence.

5 Le vecteur recombinant ayant un tropisme pour le foie peut également être construit à partir d'un vecteur non viral de type plasmidique, en particulier tel que décrit dans les demandes WO96/26270 et PCT/FR96/01414.

10 Comme indiqué ci-avant, les vecteurs de l'invention permettent la production régulée, à haut niveau, et hépatospécifique, de molécules d'intérêt. La molécule d'intérêt est avantageusement une molécule thérapeutique. Il peut s'agir d'une protéine ou d'un acide nucléique (ARNt, ARN antisens, etc).

15 De manière particulièrement préférée, la molécule thérapeutique est une protéine sécrétée dans la circulation. On peut citer à titre d'exemple les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, 20 etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou 25 artificielle (Fab, ScFv, etc, WO94/29446).

Pour assurer la sécrétion de la protéine, la cassette d'expression comprend avantageusement une séquence signal appropriée. Il peut en particulier s'agir de la séquence signal naturelle de la protéine sécrétée, si celle-ci est fonctionnelle dans une cellule hépatique. Il peut également s'agir 30 de toute séquence hétérologue appropriée. A titre d'exemple, on peut citer la séquence signal de l'apolipoprotéine AI. En outre, la cassette comporte généralement une région située en 3' qui spécifie un signal de terminaison de la transcription et de polyadénylation. On utilise par exemple le site polyA du

virus SV40. Il est entendu que le choix de ces signaux entre dans les compétences générales de l'homme du métier.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un vecteur tel que décrit ci-avant. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

En raison de leur caractère hépatospécifique, les vecteurs (notamment adénovirus) selon l'invention sont également utilisables pour la création de modèles animaux de pathologies hépatiques.

5 Par ailleurs, l'invention concerne également toute cellule modifiée par un vecteur (notamment un adénovirus) tel que décrit ci-avant. Ces cellules peuvent être utilisées pour la production de protéines recombinantes in vitro. Elles peuvent également être destinées à une implantation dans un organisme, selon la méthodologie décrite dans la demande WO95/14785. Ces cellules sont préférentiellement des cellules hépatiques.

10 La présente invention a encore pour objet un procédé de production de protéines recombinantes comprenant l'infection ou la transfection d'une population cellulaire avec un vecteur, un adénovirus recombinant ou le génome viral correspondant comprenant une cassette d'expression codant pour une protéine désirée, la culture de ladite population cellulaire
15 recombinante, et la récupération de ladite protéine produite. Avantageusement, pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, on utilise des cellules d'origine hépatique. Il peut s'agir de lignées établies ou de cultures primaires.

L'invention concerne également de nouveaux variants du promoteur
20 du gène de l'apolipoprotéine AII humain ayant des caractéristiques d'expression améliorées. Ces variants selon l'invention comprennent en particulier une répétition de motifs J tels que décrits précédemment. En outre, ces variants comprennent avantageusement une délétion dans la région comprise entre les résidus -710 et -150 du promoteur natif.

25 L'invention concerne également des promoteurs hépatospécifiques et inductibles dérivés du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain comprenant une région régulatrice composée d'un ou plusieurs motifs J du promoteur de l'apolipoprotéine AII et une région promotrice hépatospécifique issue d'un autre promoteur.

30 Avantageusement, la région promotrice hépatospécifique est issue d'un promoteur hépatospécifique autre que le promoteur du gène humain de l'apolipoprotéine AII. Préférentiellement, elle est composée d'un promoteur choisi parmi le promoteur de la sérum albumine, le promoteur de l'apolipoprotéine AI, le promoteur de l'apolipoprotéine Cs, le promoteur de

l'apolipoprotéine B100, le promoteur de la chaîne gamma du fibrinogène (JBC 270 (1995) 28350), le promoteur du gène de la phénylalanine hydroxylase humaine (PNAS 93 (1996) 728), le promoteur du gène de l'AMBP (NAR 23 (1995) 395), le promoteur du gène du facteur X (JBC 271 (1996) 2323), le promoteur du cytochrome P450 1A1 (PNAS 92 (1995) 11926), le promoteur du virus de l'hépatite B (Biol.Chem. 377 (1996) 187) ou encore le promoteur de l' α -antitrypsine. La région promoteur utilisée est préférentiellement constituée de la région nécessaire et suffisante pour l'expression hépatique (promoteur minimum). Cette région comprend généralement la boîte TATA, et peut être préparée selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme indiqué dans les références citées. Ainsi, les 209 premières paires de bases du promoteur du gène du facteur X sont suffisantes pour conférer l'expression hépatique (JBC précité). De même, des fragments -20 à -23; -54 à -57 et -66 à -77 du promoteur de la chaîne gamma du fibrinogène constituent un promoteur minimal permettant une expression hépatospécifique. Ces régions peuvent être jointes aux régions J (de préférence 1 à 5) selon la méthodologie décrite ci-avant et illustrée dans les exemples, pour générer des promoteurs hépatospécifiques et inductibles. En outre, ces promoteurs peuvent porter des séquences additionnelles de régulation de type "enhanceur", permettant d'améliorer les niveaux d'expression.

La région promotrice hépatospécifique peut également être composée d'un promoteur ubiquitaire couplé à un élément enhanceur conférant une expression hépatospécifique.

A cet égard, l'élément enhanceur conférant le caractère hépatospécifique peut être choisi parmi l'enhancer des apolipoprotéines E/C-I (J. Biol. Chem., 268 (1993) 8221-8229 et J. Biol. Chem, 270 (1995) 22577-22585), l'enhancer de l'albumine (Gene therapy, 3 (1996) 802-810), l'enhancer de la transthyrétine (Mol. Cell Biol. 15 (1995) 1364-1376), l'enhanceur du virus de l'hépatite B (Biol.Chem. 377 (1996) 187) ou encore des enhanceurs artificiels contenant des sites HNF (hepatic nuclear factors), sites de liaison aux récepteurs orphelins, membres des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Human gene therapy, 7 (1996) 159-171).

Le promoteur ubiquitaire peut être tout promoteur non spécifique d'un tissu. Il peut s'agir en particulier d'un promoteur viral ou d'un promoteur domestique ("housekeeping"). Parmi les promoteurs viraux, on peut citer plus particulièrement le promoteur SV40 (Mol Cell Biol 1982; 2:1044-1051); RSV LTR, Rous sarcoma virus long terminal repeat (PNAS USA, 1982; 79:6777-6781); CMV-IE, human cytomegalovirus (Gene 1986; 45:101-105); MoMLV LTR, Moloney murine leukemia virus (Gene Therapy 1996; 3:806-810) et le promoteur du gène HSV-TK, Thymidine Kinase (Nucleic Acid Res 1980; 8:5949-5964). Parmi les promoteurs domestiques, on peut citer le promoteur des gènes Human EF-1alpha, elongation factor (Gene 1993, 134:307-308), Beta Actine de poulet (Nucleic Acids Res 1983; 11: 8287-8301), POL II promoteur, ARN polymérase II de souris (Mol Cell Biol 1987; 7: 2012-2018); PGK, Phosphoglycerate Kinase (Gene 1987; 61: 291-298); Histone H4 (Mol Cell Biol 1985; 5:380-398), HMG, Hydroxymethylglutaryl CoA:reductase humain (Mol Cell Biol 1987; 7: 1881-1893), HK2, Hexokinase II de rat (J. Biol. Chem. 1995; 270:16918-16925) et PRP, Prion (Virus genes 1992; 6: 343-356). Tout autre promoteur ubiquitaire connu de l'homme du métier peut également être utilisé.

La région promotrice hépatospecifique peut être obtenue en couplant selon les techniques classiques de biologie moléculaire tout ou une partie fonctionnelle d'un promoteur ubiquitaire avec l'élément enhanceur ci-dessus. En particulier, les oligonucleotides correspondants aux sites J contenant les bases -737 à -715 du promoteur de l'apoA-II humaine peuvent être clonés dans les sites BamHI/GglII de pIC20H (Gene 1984; 32:481-485), digérés par HindIII, et sous clonés en 5' du promoteur ubiquitaire choisi, par exemple du promoteur de la Thymidine Kinase (TK) dans le plasmide pBLCAT4 (Nucl Acid Res 1987; 15: 5490), pour générer un vecteur contenant les sites J et un promoteur ubiquitaire devant un gène d'intérêt. L'enhancer hépatique peut être ajouté soit en 5' du promoteur ou en 3' du site de polyadenylation.

Ces variants sont particulièrement avantageux car combinent les propriétés de force d'expression, de spécificité tissulaire, et d'inductibilité. Ces différents variants peuvent être utilisés pour l'expression de gènes d'intérêt, in vitro et in vivo comme indiqué ci-avant et illustré dans les exemples.

L'invention concerne également des vecteurs recombinants comportant une cassette d'expression composée d'un gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur tel que décrit ci-avant.

L'invention concerne également une composition comprenant un vecteur recombinant tel que décrit ci-avant et un activateur de PPAR, en vue d'une utilisation simultanée ou étalée dans le temps.

Le vecteur recombinant est avantageusement un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant, et l'activateur de PPAR est avantageusement un activateur de PPAR α .

Parmi les activateurs de PPAR α , on peut utiliser plus particulièrement les fibrates ainsi que tout composé augmentant l'expression de facteurs de transcription se fixant sur les sites J.

A titre d'exemples préférés de fibrates, on peut citer par exemple l'acide fibrique et ses analogues tels que notamment le gemfibrozil (Atherosclerosis 114(1) (1995) 61), le bezafibrate (Hepatology 21 (1995) 1025), le ciprofibrate (BCE&M 9(4) (1995) 825), le clofibrate (Drug Safety 11 (1994) 301), le fénofibrate (Fenofibrate Monograph, Oxford Clinical Communications, 1995), le clinofibrate (Kidney International. 44(6) (1993) 1352), l'acide pirinixique (Wy-14,643) ou l'acide 5,8,11,14-eicosatétranoïque (ETYA). Ces différents composés sont compatibles avec une utilisation biologique et/ou pharmacologique in vitro ou in vivo.

A titre d'exemples de composés augmentant l'expression de facteurs de transcription se fixant sur les sites J, on peut citer notamment les rétinoïdes, qui activent l'expression de RXR et HFN4.

Par ailleurs, les compositions selon l'invention peuvent comporter plusieurs activateurs de PPAR en association, et en particulier un fibrate ou un analogue de fibrate associé à un rétinoïde.

Comme indiqué ci-avant, le vecteur et l'activateur peuvent être utilisés simultanément ou de manière espacée dans le temps. En outre, ils peuvent être conditionnés de manière séparée. Selon un mode de mise en oeuvre préféré, le vecteur et l'activateur sont conditionnés séparément et utilisés de manière espacée dans le temps. En particulier, le vecteur est avantageusement utilisé en premier, puis, dans un second temps, l'activateur

de PPAR. Le terme utilisé désigne la mise en contact dudit vecteur ou activateur avec les cellules, in vitro, ex vivo ou in vivo. In vitro ou ex vivo, la mise en contact peut être effectuée par incubation d'une population cellulaire telle que mentionnée plus haut avec le vecteur (par exemple de 0,01 à 1000
5 μg de vecteur pour 10^6 cellules, ou de virus à une Multiplicité d'Infection (MOI) de 0,1 à 1000), suivie d'une incubation avec l'activateur (généralement, dans une gamme de concentration comprise entre 10^{-3} mM et 10 mM, de préférence entre 10 μM et 500 μM). In vivo, par exemple pour la création d'animaux transgéniques ou pour l'expression hépatospécifique de gènes
10 d'intérêt, la mise en contact comprend généralement l'administration du vecteur (dans les conditions décrites ci-avant) suivie de l'administration de l'activateur. A cet égard, l'activateur peut être administré par voie orale, par exemple dans la nourriture (pour les animaux en particulier) ou sous forme de gélules (pour l'homme). Les doses journalières administrées aux animaux
15 sont de l'ordre de 0,01 à 1% (poids/poids), de préférence de 0,2 à 0,5 % (poids/poids). Une dose journalière typique chez la souris par exemple est de 50 mg. Une dose journalière typique de fénobibrate chez l'homme varie entre 100 et 300 mg, de préférence autour de 200mg, qui correspond à une concentration plasmatique de 15 $\mu\text{g/ml}$ environ (Vidal, 1996). En outre, des
20 administrations/incubations répétées de vecteur et/ou d'activateur peuvent être effectuées.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

25 **Légende des figures**

Figure 1 : Structure du promoteur apoAII et des formes délétées.

Figure 2 : Stratégie de duplication de la région J.

Figure 3 : Structure des promoteurs apoAII comportant une duplication
30 de la région J en 5', éventuellement combinée à des délétions internes.

Figure 4 : Structure des promoteurs apoAII comportant une duplication de la région J en interne, éventuellement combinée à des délétions internes.

Figure 5 : Représentation de l'adénovirus recombinant.

Figure 6 : Inductibilité et force de l'adénovirus recombinant in vivo.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles
5 que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN
plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels
d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par
électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-
chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de
10 l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien
connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la
littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold
Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et
al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New
15 York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13
sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories). Pour les
ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par
électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par
20 un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en
présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations
du fournisseur. Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être
effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs)
selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3'
25 proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4
(Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des
extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la
nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques
30 peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic
Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.
L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de

PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Clonage du promoteur du gène humain de l'apolipoprotéine AII.

Cet exemple décrit le clonage du promoteur du gène humain de l'apoAII. Il est entendu que toute autre technique peut être utilisée pour recloner ce promoteur. Par ailleurs, il est également possible, à partir des fragments clonés, de préparer selon les techniques de biologie moléculaire classiques des versions plus courtes en 5' et/ou en 3'.

1.1. Clonage d'un fragment -911/+29

Le promoteur de l'apolipoprotéine AII humaine a été cloné par PCR à partir d'ADN génomique humain. Des amorces ATC GAA GCT TCT GAT ATC TAT TTA ACT GAT (SEQ ID n°3) et CGT CTC TGT CCT TGG TGT CTG GAT CCA TCG (SEQ ID n°4) qui introduisent, pour la première, un site HindIII en 5' du promoteur, et pour la seconde, un site BamHI en 3', ont permis de cloner le promoteur de la position -911 à la position +29. La séquence du promoteur a été confirmée par séquençage (SEQ ID n° 1) et le fragment HindIII-BamHI introduit dans le vecteur pBLCAT5 pour vérification de l'activité transcriptionnelle.

1.2. Clonage d'un fragment -911/+160

Un fragment comportant le promoteur apoAII des résidus -911/+160 a également été obtenu à partir de la banque génomique, puis cloné dans le vecteur pBLCAT5.

Exemple 2 : Construction de variants du Promoteur AII

2.1. Création de formes tronquées

Cet exemple décrit la construction de variants du promoteur apoAll comportant une délétion interne, dans la région comprise entre les éléments de régulation localisés au niveau des nucléotides -903 à -720, et -126 à -33.

- 5 Ces variants ont été construits à partir des fragments -911/+29 et -911/+160 décrits dans l'exemple 1.

A partir des vecteurs pBLCAT5 comportant le promoteur complet sous forme d'un fragment -911/+29 ou -911/+160, la région -210 à +29 ou -210 à +160 a été obtenue par PCR en utilisant comme amorce un oligonucléotide -210/-198 de séquence 5'-GACTCTAGATGTACCCCCTTA-3' (SEQ ID n°5) et un oligonucléotide interne au gène CAT. Le fragment obtenu a été cloné dans un plasmide pBLCAT5 pour générer les plasmides -210/+160All-CAT et -210/+29All-CAT. La région distale -911 à -653 (N-I) a été obtenue par digestion du fragment -911 à +29 au moyen de l'enzyme aluI, puis clonage du fragment obtenu dans les plasmides -210/+160All-CAT et -210/+29All-CAT. La région distale -911 à -708 (N-J) a été obtenue par PCR en utilisant comme amorce un oligonucléotide -708/-722 de séquence 5'-GGAAGCTGCAGAGGCTTCTACCAG-3' (SEQ ID n°6). Le fragment obtenu a ensuite été cloné dans les plasmides -210/+160All-CAT et -210/+29All-CAT.

- 20 La structure des promoteurs est représentée sur la figure 1.

2.2. Duplication du site J

Cet exemple décrit la construction de variants du Promoteur All dans lesquels la région J a été répétée.

- 25 Les deux oligonucléotides suivants, correspondant au site J, ont été synthétisés en utilisant un synthétiseur d'ADN.

Oligo 1: 5'-gacacctCAACCTTTACCCTGGTAGa-3' (SEQ ID n°7)

Oligo 2: 5'-gatctCTACCAGGGTAAAGGTTGAag-3' (SEQ ID n°8)

- 30 Ces oligonucléotides reconstituent, à l'extrémité 3', un site BamHI et à l'extrémité 5', un site BglII. Ces oligonucléotides ont été hybridés ensemble et le fragment obtenu a été cloné aux sites BamHI-BglII dans le vecteur pIC20H

(Figure 2). Les plasmides pIC20H-J résultant ont été analysés pour déterminer le nombre de copies de sites J insérés, ainsi que leur orientation respective.

Les plasmides suivants ont été sélectionnés :

5

- un plasmide portant une seule copie du site J,
- un plasmide portant 2 copies du site J dans la même orientation,
- un plasmide portant 2 copies du site J, en orientation inverse.

10 Pour construire les variants du promoteur apoAll comportant des motifs J répétés en 5', les inserts contenus dans les plasmides ci-dessus ont été excisés sous forme de fragments HindIII et clonés en 5' du promoteur apoAll (exemple 1) ou des variants décrits dans l'exemple 2.1, au niveau d'un site HindIII. La structure des promoteurs résultants est donnée sur la figure 3.

15 Pour construire les variants du promoteur apoAll comportant des motifs J répétés en interne, les inserts contenus dans les plasmides ci-dessus ont été excisés sous forme de fragments de restriction appropriés, puis clonés dans le promoteur apoAll (exemple 1) ou dans les variants décrits dans l'exemple 2.1, au niveau d'un site correspondant situé entre la région J native et la région de régulation -126-33 du promoteur natif. La structure des promoteurs
20 résultants est donnée sur la figure 4.

Le nombre de copies de la région J dans la construction finale est déterminé par le choix du plasmide.

Exemple 3 : Etude de la fonctionnalité des variants du promoteur apoAll.

25 La fonctionnalité des promoteurs a été étudiée par transfection dans une lignée cellulaire hépatique, les cellules HepG2. Une expérience contrôle a été effectuée dans une lignée cellulaire non-hépatique, les cellules Hela.

Les transfections dans les cellules HepG2 ont été réalisées à 50-60% de confluence par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Les cellules ont été co-transfectées par un mélange de plasmides comprenant :

30

- le plasmide test

- un plasmide d'expression du PPAR α (PBK-CMV-PPAR α) ou le plasmide correspondant vide (PBK-CMV), et,
- 0,5 μ g d'un plasmide d'expression de la β -Gal (CMV- β -Gal) comme controle de l'efficacité de transfection.

- 5 Toutes les transfections ont été réalisées avec la même quantité d'ADN total. 4 h après la transfection, les cellules sont lavées dans un tampon PBS, puis incubées 24 heures avec le fibraté (Wy-14643, 1 μ M). L'activité CAT est ensuite déterminée selon la méthode de Gorman et al (Mol.Cell.Biol. 2 (1982) 1044). Les résultats sont ensuite rapportés à l'efficacité de transfection telle
- 10 que mesurée par l'expression de la β -Gal.
- Les résultats obtenus pour deux séries d'expérience sont présentés dans les Tableaux 1 et 2 ci-après.

Tableau 1 : Activité des Promoteurs sur cellules hépatiques

Promoteur	Vecteur	Activateur	Activité CAT	Correction β -Gal
phA-II	PBK-CMV	-	2,52	5,52
	PBK-CMV	Wy	5,37	11,75
	mPPARa	-	12,44	27,22
	mPPARa	Wy	12,04	26,34
phA-II(J3)	PBK-CMV	-	4,17	9,13
	PBK-CMV	Wy	7,80	17,06
	mPPARa	-	15,67	34,29
	mPPARa	Wy	24,96	54,61
phA-II N-I	PBK-CMV	-	1,31	2,86
	PBK-CMV	Wy	2,46	5,38
	mPPARa	-	3,58	7,83
	mPPARa	Wy	14,77	32,31
phA-II N-I(J3)	PBK-CMV	-	1,32	2,89
	PBK-CMV	Wy	2,95	6,45
	mPPARa	-	7,81	17,10
	mPPARa	Wy	17,51	38,32
phA-II N-J	PBK-CMV	-	0,37	0,80
	PBK-CMV	Wy	0,41	0,90
	mPPARa	-	0,44	0,97
	mPPARa	Wy	1,11	2,42
phA-II N-J(J3)	PBK-CMV	-	0,46	1,00
	PBK-CMV	Wy	0,77	1,69
	mPPARa	-	4,04	8,83
	mPPARa	Wy	13,06	28,59

Tableau 2 : Activité des Promoteurs sur cellules hépatiques

Promoteur	Vecteur	Activateur	Activité CAT	Correction β -Gal
phA-II	PBK-CMV	-	5,03	2,12
	PBK-CMV	Wy	6,68	3,41
	mPPARa	-	49,77	16,99
	mPPARa	Wy	60,86	32,20
phA-II(J3)	PBK-CMV	-	5,80	2,16
	PBK-CMV	Wy	8,17	3,50
	mPPARa	-	69,71	17,08
	mPPARa	Wy	81,20	21,15
phA-II N-I	PBK-CMV	-	2,91	1,25
	PBK-CMV	Wy	1,35	0,67
	mPPARa	-	20,85	3,88
	mPPARa	Wy	32,34	8,86
phA-II N-I(J3)	PBK-CMV	-	2,20	1,19
	PBK-CMV	Wy	3,01	1,68
	mPPARa	-	57,07	11,65
	mPPARa	Wy	75,39	17,53
phA-II N-J	PBK-CMV	-	2,02	1,50
	PBK-CMV	Wy	0,56	0,37
	mPPARa	-	1,65	0,49
	mPPARa	Wy	2,91	1,26
phA-II N-J(J3)	PBK-CMV	-	1,04	0,64
	PBK-CMV	Wy	0,55	0,60
	mPPARa	-	21,40	3,87
	mPPARa	Wy	30,56	9,95

Ces résultats font apparaître clairement que la duplication du motif J dans le promoteur n'altère pas la force du promoteur, et augmente très significativement son inductibilité par les fibrates.

5 Par ailleurs, dans une expérience contrôle réalisée dans les cellules Hela, aucune inductibilité par les fibrates ou par le PPAR n'a été observée. Ceci démontre que les promoteurs selon l'invention conservent leur spécificité tissulaire.

10 Ces résultats démontrent donc que les promoteurs selon l'invention sont forts, hautement inductibles, et spécifiques des cellules hépatiques. En outre, les promoteurs phA-II N-I(J3); phA-II' N-I(J3); phA-II N-J(J3); phA-II' N-J(J3); phA-II N-I(J3i); phA-II' N-I(J3i); phA-II N-J(J3i) et phA-II' N-J(J3i) possèdent l'avantage d'être de petite taille, comparés au promoteur apoAII
15 natif. Ceci permet donc avantageusement, dans un vecteur de transfert et/ou d'expression de gènes, d'avoir une capacité de clonage supérieure.

Exemple 4 : Construction d'adénovirus inductibles et hépatospécifiques.

20 Cet exemple décrit la construction d'adénovirus inductibles et hépatospécifiques, et donnant des niveaux d'expression très élevés. Ces adénovirus sont utiles pour l'expression de gènes in vitro, ex vivo ou in vivo. Les adénovirus décrits ont été construits à partir du sérotype Ad5. Il est
25 entendu que tout autre sérotype peut être utilisé, et notamment les sérotypes Ad2, Ad7, Ad12 et CAV2. Les adénovirus ont été construits par recombinaison homologe, dans une lignée de packaging, entre un vecteur navette apportant partie gauche du génome viral et l'ADN d'un adénovirus linéarisé, apportant la partie droite du génome viral.

30

4.1. Construction des vecteurs navette

Le vecteur navette construit porte une cassette d'expression constituée d'un promoteur apoAII et d'un acide nucléique codant pour une molécule sécrétée
35 : l'apolipoprotéine AI (apoAI). Ce vecteur apporte en outre la partie gauche

du génome viral, c'est-à-dire l'ITR gauche et une région permettant la recombinaison.

Les vecteurs navette servant à la construction de l'adénovirus ont été
5 construits à partir d'un plasmide pCO5 (WO96/22378), d'un plasmide
pIC20H-Alb-U-AI-SV40 qui contient le premier intron de l'apoA1 et l'ADNc de
l'apoA1 sous contrôle d'un promoteur de l'albumine de Rat, et d'un plasmide
pBLAIIICAT5 qui contient un promoteur apoAII tel que décrit dans l'exemple 1
ou un variant selon l'exemple 2.

10

a) Construction de pIC20H-Alb-U-AI-SV40

Les deux amorces GCG GCC GCT TCG AGC AGA CAT GAT AA (SEQ ID
n°9) et CGA TCT CAA GGG CAT CGG TCG ACG G (SEQ ID n°10) ont
15 permis l'amplification des séquences de polyadénylation de SV40 dans
l'orientation tardive. L'amorce 5' introduit un site NotI en amont de cette
séquence et l'amorce 3' introduit un demi site NruI. Le fragment PCR obtenu
est traité par la klenow pour obtenir des bouts francs et cloné dans le vecteur
pIC20H clivé par SmaI et NruI, dans l'orientation qui régénère un site NruI. Le
20 plasmide résultant est appelé pIC20H-SV40.

La construction pXL2336 contenant un minigène de l'apolipoprotéine A1 a été
décrite précédemment (WO94/25073). Un fragment PCR est amplifié à partir
de pXL2336 grâce aux amorces GGG ATC CGC TGG CTG CTT AGA GAC
25 TGC (SEQ ID n°11) et GGC GGC CGC CGG GAA GGG GGC CGG CGG
(SEQ ID n°12) qui introduisent respectivement un site BamHI en amont du
premier exon de l'ApoA1 et un site NotI en aval de la séquence codante de
l'ApoA1.

Le fragment PCR est cloné dans pCRII (Invitrogen) et sa séquence vérifiée.
30 Le fragment BamHI/NotI contenant l'ADNc et le premier intron de l'apoA-I est
ensuite cloné aux mêmes sites du plasmide pIC20H-SV40 pour générer le
plasmide pIC20H-AI-SV40.

Les oligonucléotides CAC GTG CTT GTT CTT TTT GCA GAA GCT CAG
AAT AAA CGC TCA ACT GTG GC (SEQ ID n°13) et CGT GGC CAC AGT
35 TGA GCG TTT ATT CTG AGC TTC TGC AAA AAG AAC AAG CA (SEQ ID

n°14) sont ensuite hybridés entre eux et clonés au site Dsal de pIC20H-AI-SV40 de façon à ce que le site PmlI créé lors de ce clonage soit du côté de l'intron et que le site Dsal soit régénéré à l'autre extrémité. Ces oligonucléotides permettent d'introduire un fragment de la partie 5' non traduite de l'ARN messager de la β Globine. Le plasmide obtenu est appelé pIC20H-U-AI-SV40.

Enfin, le fragment HindIII/BglII du promoteur de l'albumine de Rat décrit par F. Troche et al (Mol.Cel.Biol, 1989, 4759-4766) traité par la Klenow a été cloné dans l'orientation adéquate dans le plasmide pIC20H-U-AI-SV40 clivé par BamHI et traité également par la klenow pour générer le plasmide pIC20H-Alb-U-AI-SV40.

b) Construction des vecteurs navette

Les oligonucléotides CGT GGC AGG CAG CAG GAC GCA CCT CCT TCT CGC AGT CTC TAA GCA GCC TTC GAA GCA TG (SEQ ID n°15) et CTT CGA AGG CTG CTT AGA GAC TGC GAG AAG GAG GTG CGT CCT GCT GCC TGC CA (SEQ ID n°16) sont hybridés entre eux ce qui crée une extrémité cohesive SphI et une extrémité cohésive HpaII. Ce fragment est introduit dans une ligation trois partenaires avec un fragment HpaII/DraIII (476/1518) du plasmide pIC20HAlb-U-AI-SV40 contenant le cDNA de l'ApoAI et un fragment DraIII/SphI (1518/239) du même plasmide. Le plasmide résultant est appelé pXL2699. Cette construction crée un site BstBI compatible avec ClaI en amont du fragment ADNc + intron de l'apoAI. Le fragment BstBI / Sall de pXL2699, contenant l'ADNc de l'ApoAI, est cloné dans le plasmide pCO5 clivé par ClaI et Sall. Le plasmide résultant est appelé pCO5-U-AI-SV40.

Le promoteur apoAII sélectionné (promoteur complet ou variants) est excisé du plasmide pBLAIIICAT5 correspondant sous forme d'un fragment HindIII-BamHI, cloné après traitement à la Klenov au site EcoRV du plasmide pCO5-U-AI-SV40 pour générer les vecteurs navette pXLPromAII/AI. Les vecteurs suivants sont ainsi obtenus :

Vecteur Navette	Version du Promoteur
pXLAII/AI	-911/+29
pXLhAII/AI	-911/+160
pXLAII(J3)/AI	-911/+29, 3motifs J en 5'
pXLAIIIN-I/AI	-911/-653;-210/+29
pXLAIIIN-I(J3)/AI	-911/-653;-210/+29; 3motifs J en 5'
pXLAIIIN-J/AI	-911/-708;-210/+29
pXLAIIIN-J(J3)/AI	-911/-708;-210/+29; 3motifs J en 5'

- Ces vecteurs sont validés pour l'expression de l'apoAI humaine par transfection transitoire dans les lignées 293 ou Cos1. Il est entendu que l'acide nucléique codant pour l'apolipoprotéine AI humaine peut être
- 5 aisément remplacée dans les vecteurs navette par tout autre acide nucléique codant pour une molécule d'intérêt.

4.2. Construction des adénovirus

- Les adénovirus ont été produits par recombinaison homologue, après co-
- 10 transfection, dans les cellules appropriées, de deux fragments d'ADN, l'un apportant la partie gauche du génome du virus recombinant (vecteur navette décrit dans l'exemple 4.1., possédant une délétion dans la région E1), l'autre apportant la partie droite du génome du virus recombinant (possédant éventuellement une délétion dans la région E4 et/ou E3).

- 15 a) Construction d'adénovirus défectifs pour la région E1

- L'adénovirus Ad-AII/AI a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'ADN du virus Ad-RSV- β Gal et le vecteur navette pXL AII/AI, selon le
- 20 protocole suivant : le vecteur navette pXL AII/AI linéarisé par BstXI et l'ADN du virus Ad-RSV- β Gal linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants générés ont ensuite été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce

qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456), ou par chromatographie (FR96 08164).
5 L'adénovirus Ad-All/Al peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol. La structure du génome recombinant est présentée sur la figure 5.

La même stratégie est suivie pour construire les adénovirus portant les
10 différentes formes de promoteurs All, en partant des vecteurs navettes décrits dans l'exemple 4.1.

b) Construction d'adénovirus défectifs pour les régions E1 et E4

Les cellules IGRP2 (Yeh et al., J. Virol 70 (1996) 559), capables de transcomplémenter les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, sont
15 cotransfectées par 5 mg du vecteur navette digéré par BstX1, et 10 mg de l'ADN du virus apportant la délétion fonctionnelle de la région E4 (par exemple Ad2dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1007 ou Ad5dl1014) digéré par l'enzyme Cla1. Après apparition de l'effet cytopathique, les virus sont purifiés
20 par au moins deux cycles consécutifs d'étalement en solide pour la formation de plages sur IGRP2. Les plages correspondant à l'infection du virus recherché (analyse de l'ADN démontrant la double délétion E1 et E4) sont alors amplifiées par des cycles d'infection consécutives. Des stocks à titre élevés sont préparés par purification sur gradient de chlorure de césium. Les virus sont conservés à -80°C selon les techniques classiques de l'homme de
25 l'art.

Exemple 5 : Activité in vivo des adénovirus recombinants

Cet exemple décrit les propriétés fonctionnelles des adénovirus de
30 l'invention, après administration in vivo.

5×10^9 pfu des virus Ad(ApoAllprom-ApoAl-SV40 et Ad(RSV-ApoAl-bGH) ont été injectés respectivement à 8 et 3 souris C57bl6. Quatre des souris injectées avec le Ad(ApoAllprom-ApoAl-SV40) ont été nourries avec du

fenofibrate à la dose de 0,5% (p/p) mélangée à leur alimentation. Les concentrations plasmatiques en apoA-I humaine et HDL-cholesterol ont été mesurées chaque semaine. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6.

- 5 Les niveaux d'apoA-I plasmatique sont inférieurs au seuil de détection (10 mg/dl) pour les souris injectées avec le virus Ad(ApoAllprom-ApoAI-SV40), 81 ± 0.17 mg/dl pour les souris injectées avec le virus Ad(ApoAllprom-ApoAI-SV40) traitées au fenofibrate et 84 ± 15 mg/dl pour les souris injectées avec le virus Ad(RSV-ApoAI-bGH) ce qui montre une induction d'au moins 8 fois du
- 10 promoteur de l'apoA-II dans ces conditions.
- Le niveau de HDL-cholesterol n'est pas modifié pour les souris injectées avec le virus Ad(ApoAllprom-ApoAI-SV40) (52 ± 2 mg/dl) : niveau identique à des animaux non traités. En revanche, le niveau de HDL-cholestérol est augmenté au jour 7 jusqu'à 88 ± 14 mg/dl et 121 ± 22 mg/dl pour
- 15 respectivement pour les souris injectées avec le virus Ad(RSV-ApoAI-bGH) et les souris injectées avec le virus Ad(ApoAllprom-ApoAI-SV40) traitées au fenofibrate (figure 6).

- Ces résultats démontrent in vivo le caractère fort, inductible et
- 20 hépatospécifique des promoteurs de l'invention dans un contexte adénoviral. Combinées aux propriétés remarquables de transfert de gènes des adénovirus, les vecteurs de l'invention présentent des performances très avantageuses pour le transfert et l'expression de gènes.

LISTE DE SEQUENCES

5 SEQ ID n° 1 : Séquence du promoteur apoAII humain (-911 +29).

AGCTTCTGAT ATCTATTTAA CTGATTTTAC CCAAATGCTT TGAACCTGGG
 -911 -901
 AATGTACCTC TCCCCCTCCC CCACCCCCAA CAGGAGTGAG ACAAGGGCCA
 10 GGGCTATTGC CCCTGCTGAC TCAATATTGG CTAATCACTG CCTAGAACTG
 -811
 ATAAGGTGAT CAAATGACCA GGTGCCTTCA ACCTTTACCC TGGTAGAAGC
 -734 -716
 15 CTCTTATTCA CCTCTTTTCC TGCCAGAGCC CTCCATTGGG AGGGGACGGG
 -711
 CGGAAGCTGT TTTCTGAATT TGTTTTACTG GGGGTAGGGT ATGTTCACTG
 ATCAGCATCC AGGTCATTCT GGGCTCTCCT GTTTTCTCCC CGTCTCATTA
 -611
 20 CACATTAACCT CAAAAACGGA CAAGATCATT TACACTTGCC CTCTTACCCG
 ACCCTCATTC CCCTAACCCC CATAGCCCTC AACCTGTCC CTGATTTCAA
 -511
 25 TTCCTTTCTC CTTTCTTCTG CTCCCCAATA TCTCTCTGCC AAGTTGCAGT
 AAAGTGGGAT AAGGTTGAGA GATGAGATCT ACCCATAATG GAATAAAGAC
 -411
 ACCATGAGCT TTCCATGGTA TGATGGGTTG ATGGTATTCC ATGGGTTGAT
 30 ATGTCAGAGC TTTCCAGAGA AATAACTTGG AATCCTGCTT CCTGTTGCAT
 -311
 TCAAGTCCAA GGACCTCAGA TCTCAAAAGA ATGAACCTCA AATATACCTG
 AAGTGTACCC CCTTAGCCTC CACTAAGAGC TGTACCCCTT GCCTCTCACC
 -211
 35 CCATCACCAT GAGTCTTCCA TGTGCTTGTC CTCTCCTCCC CCATTTCTCC
 AACTTGTTTA TCCTCACATA ATCCCTGCCC CACTGGGCCC ATCCATAGTC
 -111
 40 CCTGTACCT GACAGGGGGT GGGTAAACAG ACAGGTATAT AGCCCCCTCC
 TCTCCAGCCA GGGCAGGCAC AGACACCAAG GACAGAGACG
 -11 +1 +10

45

SEQ ID n° 2 : Séquence de la région J

TCAACCTTTA CCCTGGTAG

SEQ ID n°3 :

50 ATCGAAGCTT CTGATATCTA TTAACTGAT

SEQ ID n°4

CGTCTCTGTC CTTGGTGTCT GGATCCATCG

SEQ ID n°5

5 GACTCTAGATGTACCCCCTTA

SEQ ID n°6

GGAAGCTGCAGAGGCTTCTACCAG

10 SEQ ID n°7

gatecctTCAACCTTTACCCTGGTAGa

SEQ ID n°8

gatctctTACCAGGGTAAAGGTTGAag

15

SEQ ID n°9

GCG GCC GCT TCG AGC AGA CAT GAT AA

SEQ ID n°10

20 CGA TCT CAA GGG CAT CGG TCG ACG G

SEQ ID n°11

GGG ATC CGC TGG CTG CTT AGA GAC TGC

25 SEQ ID n°12

GGC GGC CGC CGG GAA GGG GGG CGG CGG

SEQ ID n°13

CAC GTG CTT GTT CTT TTT GCA GAA GCT CAG AAT AAA CGC TCA ACT

30 GTG GC

SEQ ID n°14

CGT GGC CAC AGT TGA GCG TTT ATT CTG AGC TTC TGC AAA AAG AAC
AAG CA

SEQ ID n°15

5 CGT GGC AGG CAG CAG GAC GCA CCT CCT TCT CGC AGT CTC TAA GCA
GCC TTC GAA GCA TG

SEQ ID n°16

CTT CGA AGG CTG CTT AGA GAC TGC GAG AAG GAG GTG CGT CCT GCT
10 GCC TGC CA

REVENDECATIONS

1. vecteur recombinant pour l'expression inductible et hépatospécifique d'une molécule caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression
5 constituée d'un acide nucléique codant pour ladite molécule placé sous contrôle du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain.
2. Vecteur recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que le promoteur comprend les éléments de régulation localisés au niveau des nucléotides -903 à -680; -573 à -255 et -126 à -33 du promoteur du gène de
10 l'apolipoprotéine AII humain.
3. Vecteur recombinant selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est comprise entre les résidus +5 et +35, plus préférentiellement +10 et +30 du gène apoAII.
4. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en
15 ce que l'extrémité 5' du promoteur est comprise entre les résidus -950 à -905, de préférence -925 à -910 du gène apoAII.
5. Vecteur recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que le promoteur comprend la séquence SEQ ID n° 1 (résidus -911 à +29).
6. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 1, 3 ou 4 caractérisé
20 en ce que le promoteur comprend les éléments de régulation localisés au niveau des nucléotides -903 à -680, ou -903 à -720, et -126 à -33 du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain, mais pas les éléments intermédiaires localisés au niveau des nucléotides -573 à -255.
7. Vecteur recombinant selon la revendication 6 caractérisé en ce que le
25 promoteur comprend une délétion dans la région comprise entre les résidus -670 et -210, de préférence une délétion des résidus -653-210.
8. Vecteur recombinant selon la revendication 6 caractérisé en ce que le promoteur comprend une délétion dans la région comprise entre les résidus
-710 et -150.
- 30 9. Vecteur recombinant selon la revendication 8 caractérisé en ce que le promoteur comprend une délétion des résidus -708-210.

10. Vecteur recombinant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le promoteur comprend une répétition de motifs J.
11. Vecteur recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur comprend de 2 à 5 motifs J.
- 5 12. Vecteur recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce que la répétition de motifs J est positionnée en 5' du promoteur.
13. Vecteur recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce que la répétition de motifs J est positionnée en 3' du promoteur.
14. Vecteur recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce que la
10 répétition de motifs J est insérée dans la séquence du promoteur.
15. Vecteur recombinant selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur comprend une région régulatrice composée d'un ou plusieurs motifs J et une région promotrice hépatospécifique.
16. Vecteur recombinant selon la revendication 15 caractérisé en ce que la
15 région promotrice hépatospécifique est composée d'un promoteur hépatospécifique choisi parmi le promoteur de la sérum albumine, le promoteur de l'apolipoprotéine AI, le promoteur de l'apolipoprotéine Cs, le promoteur de l'apolipoprotéine B100, le promoteur de la chaîne gamma du fibrinogène, le promoteur du gène de la phénylalanine hydroxylase humaine,
20 le promoteur du gène de l'AMBP, le promoteur du gène du facteur X et le promoteur de l' α -antitrypsine.
17. Vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendication 1 à 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant.
18. Adénovirus recombinant selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il
25 comprend une délétion dans la région E1 de son génome.
19. Adénovirus recombinant selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion des régions E1a et E1b.
20. Adénovirus recombinant selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une délétion dans la région E4 de son génome.
- 30 21. Adénovirus recombinant selon la revendication 20 caractérisé en ce que la délétion dans la région E4 affecte l'ensemble des phases ouvertes.

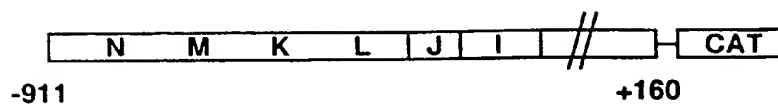
22. Adénovirus recombinant selon les revendications 18 à 21 caractérisé en ce que la cassette d'expression est insérée au niveau de la région E1, en remplacement des séquences délétées.
- 5 23. Adénovirus recombinant selon les revendications 18 à 21 caractérisé en ce que la cassette d'expression est insérée au niveau de la région E4, en remplacement des séquences délétées.
24. Adénovirus recombinant selon les revendications 18 à 21 caractérisé en ce que la cassette d'expression est insérée au niveau de la région E3.
- 10 25. Vecteur recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que la molécule est une protéine thérapeutique.
26. Vecteur recombinant selon la revendication 25 caractérisé en ce que la molécule thérapeutique est une protéine sécrétée dans la circulation.
- 15 27. Vecteur recombinant selon la revendication 25 caractérisé en ce que la protéine thérapeutique est choisie parmi les hormones, les lymphokines, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques, les apolipoprotéines, les suppresseurs de tumeurs et les facteurs impliqués dans la coagulation.
- 20 28. Vecteur adénoviral comprenant une cassette d'expression constituée d'un acide nucléique codant pour une molécule d'intérêt placé sous contrôle du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain.
29. Variant du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain comprenant une répétition de motifs J.
30. Variant selon la revendication 29 caractérisé en ce qu'il comprend de 2 à 5 motifs J.
- 25 31. Variant selon la revendication 29 ou 30 caractérisé en ce que les motifs J additionnels sont positionnés en 5' du promoteur.
32. Variant selon l'une des revendications 29 à 31 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une délétion dans la région comprise entre les résidus -710 et -150 du promoteur natif.
- 30 33. Variant du promoteur du gène de l'apolipoprotéine AII humain caractérisé en ce qu'il comprend une région régulatrice composée d'un ou plusieurs

motifs J du promoteur de l'apolipoprotéine All et une région promotrice hépatospécifique issue d'un autre promoteur.

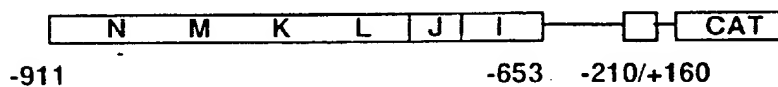
34. Variant selon la revendication 33 caractérisé en ce la région promotrice hépatospécifique est composée d'un promoteur hépatospécifique autre que le promoteur du gène de l'apolipoprotéine All humain.
35. Variant selon la revendication 33 caractérisé en ce la région promotrice hépatospécifique est composée d'un promoteur ubiquitaire couplé à un élément enhanceur conférant une expression hépatospécifique.
36. Cellule modifiée par un vecteur selon l'une des revendications 1 à 28.
37. Composition pharmaceutique comprenant un adénovirus selon la revendication 17 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
38. Procédé de production d'une protéine recombinante désirée comprenant:
- l'infection ou la transfection d'une population cellulaire avec un vecteur recombinant selon la revendication 1 ou un génome viral comprenant une cassette d'expression codant pour ladite protéine désirée,
 - la culture de ladite population cellulaire recombinante, et,
 - la récupération de ladite protéine produite.
39. Utilisation d'un adénovirus selon la revendication 17 pour préparer un modèle animal non-humain transgénique.
40. Composition comprenant un vecteur recombinant selon l'une des revendications 1 à 28 et un activateur de PPAR, en vue d'une utilisation simultanée ou étalée dans le temps.
41. Composition selon la revendication 40 caractérisée en ce que le vecteur est un adénovirus recombinant selon la revendication 17.
42. Composition selon la revendication 40 ou 41 caractérisée en ce que l'activateur de PPAR est un activateur de PPAR α .
43. Composition selon la revendication 42 caractérisée en ce que l'activateur de PPAR α est choisi parmi les fibrates et les composés augmentant l'expression de facteurs de transcription se fixant sur les sites J.
44. Composition selon la revendication 43 caractérisée en ce que le fibrate est choisi parmi l'acide fibrique, le gemfibrozil, le bezafibrate, le ciprofibrate, le clofibrate, le fénofibrate et le clinofibrate.

1/6

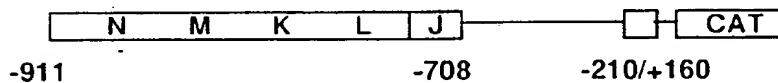
phA-II



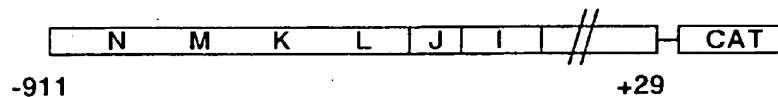
A-II N-I



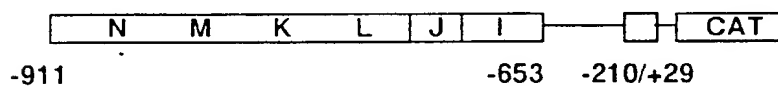
A-II N-J



phA-II'



A-II' N-I



A-II' N-J

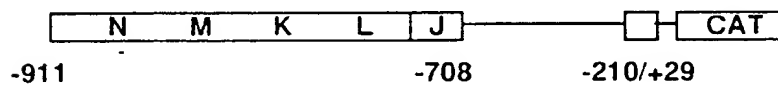


Figure 1

2/6

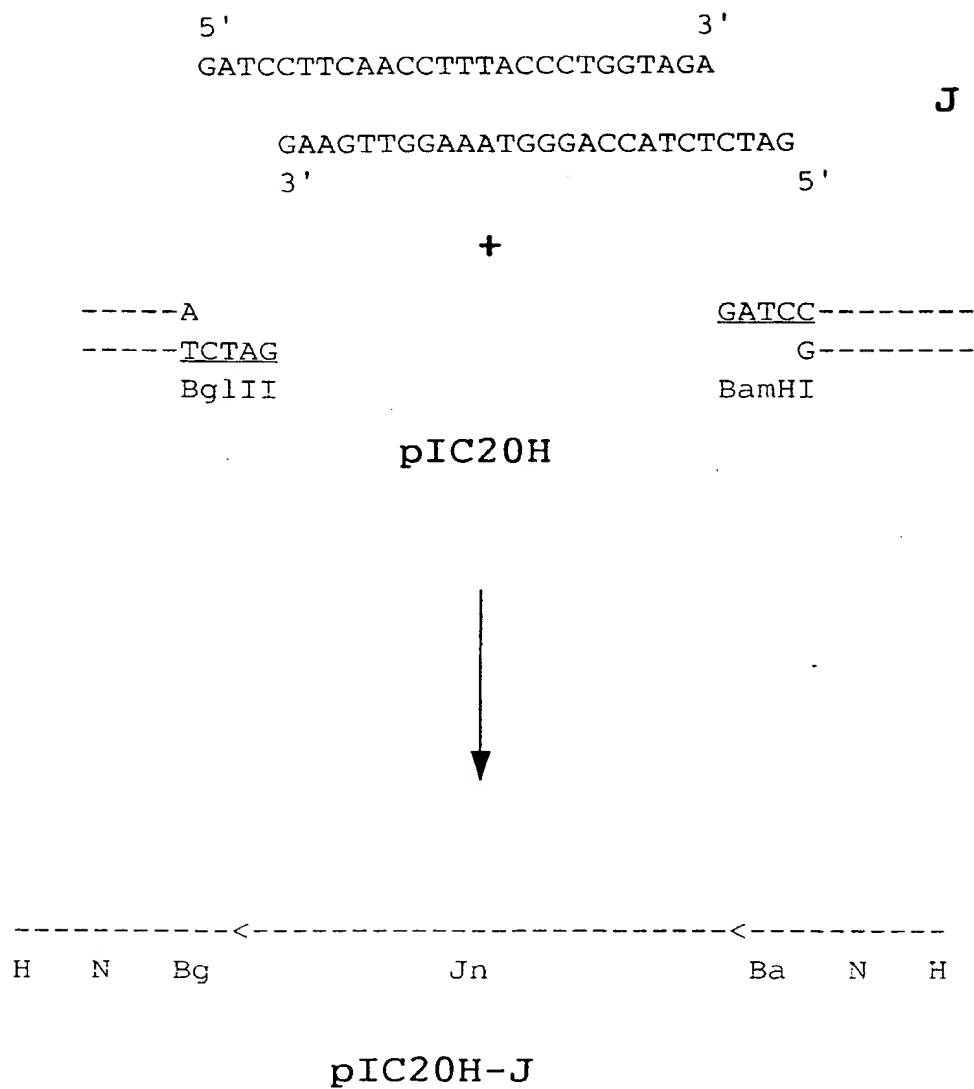


Figure 2

3/6

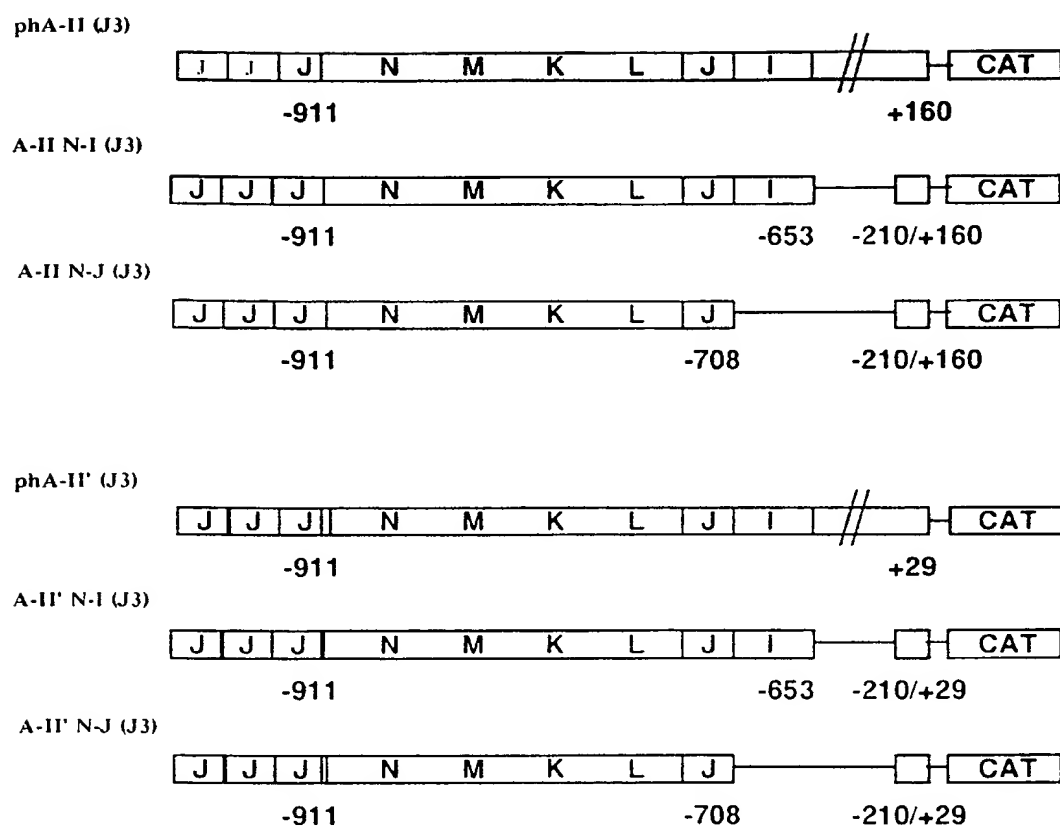


Figure 3

4/6

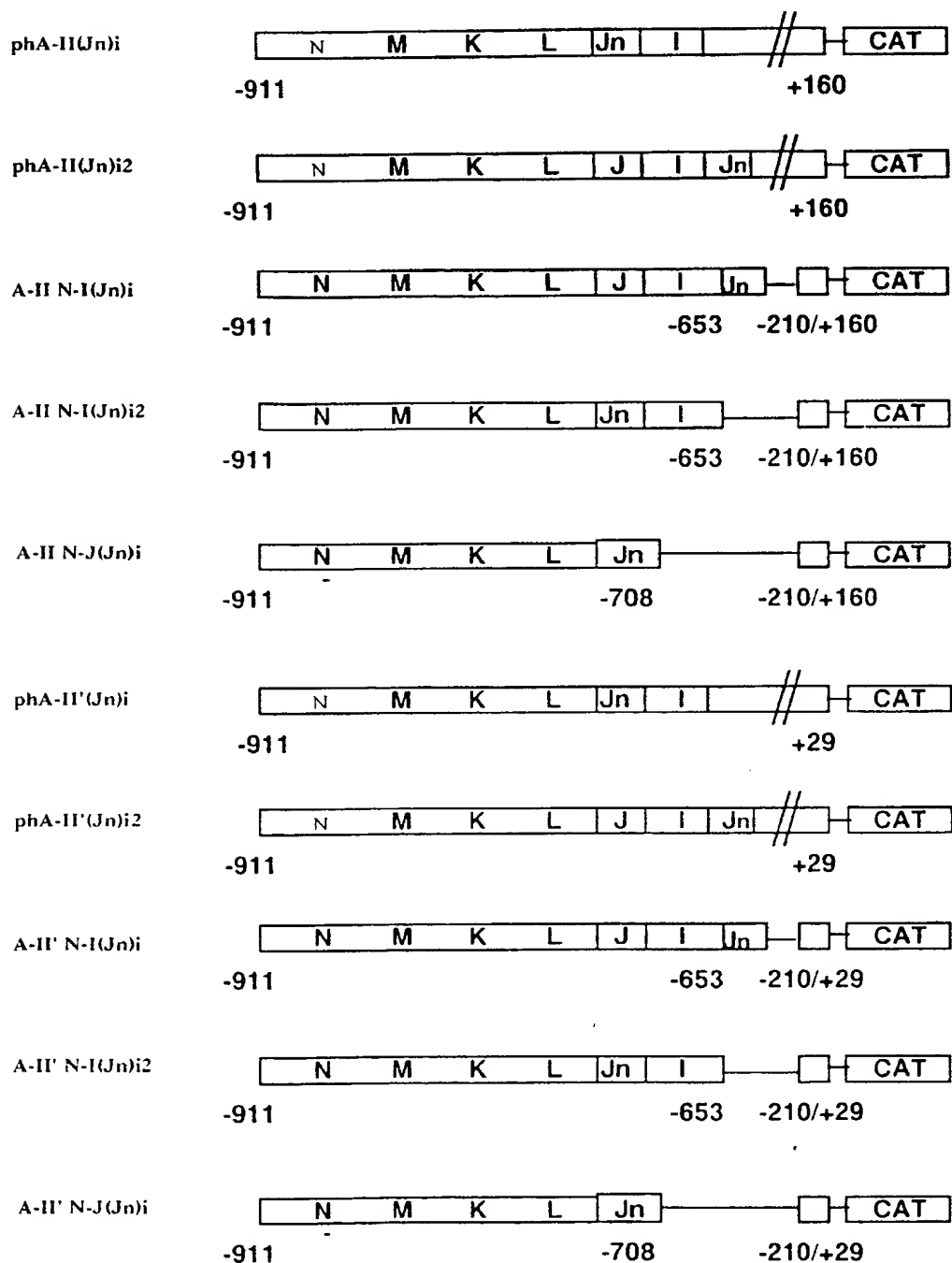


Figure 4

5/6

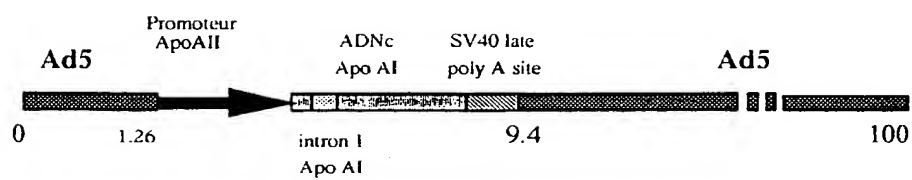


Figure 5

6/6

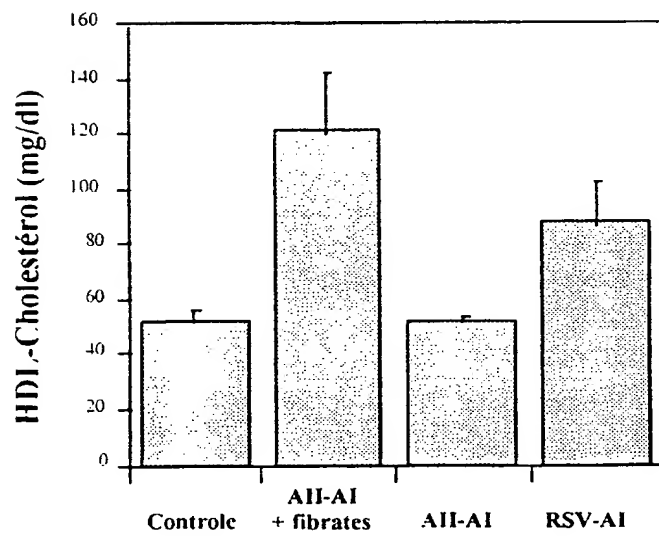
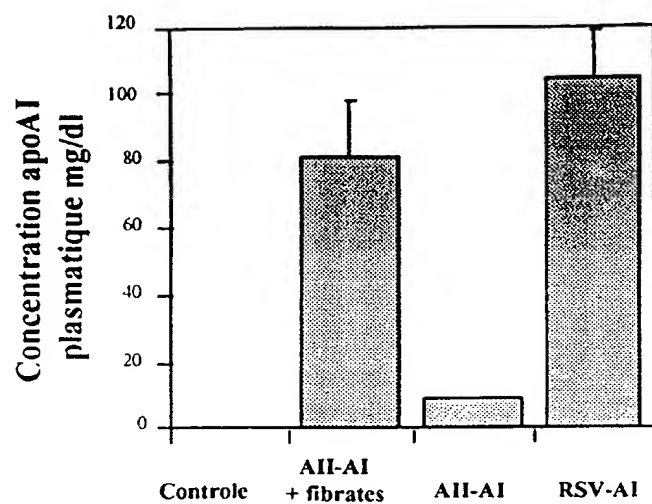


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 97/01992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/85 C12N15/86 C07K14/775

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 516 443 A (LILLY CO ELI) 2 December 1992	38
Y	see the whole document	1
X	Y-K. TSAO ET AL.: "Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-II gene" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 260, no. 28, 1985, BETHESDA, MD, US, pages 15222-15231, XP002037603 cited in the application	5
Y	see the whole document	1
A		2-4, 16-19, 25-28, 39-44

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 1998

Date of mailing of the international search report

21.04.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 97/01992

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.S. SHELLEY ET AL.: "Comparison of the human apolipoprotein genes. Apo AII presents a unique functional intron-exon junction" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 186, 1985, LONDON, GB, pages 43-51, XP002060850	2-5
Y	see the whole document and especially figure 2	1
A	--- J.N. ROTTMAN ET AL.: "A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 11, no. 7, 1991, WASHINGTON, DC, US, pages 3814-3820, XP002037604 cited in the application see the whole document	1-4,16, 26-28, 40-44
A	--- WO 94 25073 A (RHONE POULENC RORER SA) 10 November 1994 cited in the application see the whole document	16-19, 21, 25-28,39 38
A	--- R. TUTEJA ET AL.: "Transcription efficiency of human apolipoproteine A-I promoter varies with naturally occurring A to G transition" FEBS LETTERS, vol. 304, no. 1, 1992, AMSTERDAM, NL, pages 98-101, XP000304569 see the whole document	1-4,16, 25-28
A	--- WO 95 25793 A (RHONE POULENC RORER SA, INSTITUT NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 28 September 1995 see the whole document	39
A	--- WO 96 13596 A (RHONE POULENC RORER SA) 9 May 1996 see the whole document -----	17-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0516443 A	02-12-92	CA 2070058 A JP 5227968 A	01-12-92 07-09-93
WO 9425073 A	10-11-94	FR 2704556 A AU 6572294 A BR 9406689 A CA 2161679 A EP 0701450 A FI 955154 A JP 8509373 T NO 954286 A ZA 9402980 A	04-11-94 21-11-94 30-01-96 10-11-94 20-03-96 27-10-95 08-10-96 26-10-95 18-01-95
WO 9525793 A	28-09-95	FR 2718329 A CA 2184202 A EP 0751993 A JP 10501683 T	13-10-95 28-09-95 08-01-97 17-02-98
WO 9613596 A	09-05-96	FR 2726285 A AU 3847795 A EP 0787199 A FI 971783 A NO 971764 A ZA 9509086 A	03-05-96 23-05-96 06-08-97 25-04-97 17-04-97 16-07-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/01992

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/85 C12N15/86 C07K14/775		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 516 443 A (LILLY CO ELI) 2 décembre 1992	38
Y	voir le document en entier	1
X	Y-K. TSAO ET AL.: "Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-II gene" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 260, no. 28, 1985, BETHESDA, MD, US, pages 15222-15231, XP002037603 cité dans la demande	5
Y	voir le document en entier	1
A		2-4, 16-19, 25-28, 39-44

	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 31 mars 1998		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 21.04.98
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/01992

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	C.S. SHELLEY ET AL.: "Comparison of the human apolipoprotein genes. Apo AII presents a unique functional intron-exon junction" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 186, 1985, LONDON, GB, pages 43-51, XP002060850	2-5
Y	voir le document en entier et spécialement la figure 2	1
A	--- J.N. ROTTMAN ET AL.: "A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 11, no. 7, 1991, WASHINGTON, DC, US, pages 3814-3820, XP002037604 cité dans la demande voir le document en entier	1-4,16, 26-28, 40-44
A	--- WO 94 25073 A (RHONE POULENC RORER SA) 10 novembre 1994 cité dans la demande	16-19, 21, 25-28,39
X	voir le document en entier	38
A	--- R. TUTEJA ET AL.: "Transcription efficiency of human apolipoproteine A-I promoter varies with naturally occurring A to G transition" FEBS LETTERS, vol. 304, no. 1, 1992, AMSTERDAM, NL, pages 98-101, XP000304569 voir le document en entier	1-4,16, 25-28
A	--- WO 95 25793 A (RHONE POULENC RORER SA, INSTITUT NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 28 septembre 1995 voir le document en entier	39
A	--- WO 96 13596 A (RHONE POULENC RORER SA) 9 mai 1996 voir le document en entier -----	17-25

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 97/01992

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0516443 A	02-12-92	CA 2070058 A JP 5227968 A	01-12-92 07-09-93
WO 9425073 A	10-11-94	FR 2704556 A AU 6572294 A BR 9406689 A CA 2161679 A EP 0701450 A FI 955154 A JP 8509373 T NO 954286 A ZA 9402980 A	04-11-94 21-11-94 30-01-96 10-11-94 20-03-96 27-10-95 08-10-96 26-10-95 18-01-95
WO 9525793 A	28-09-95	FR 2718329 A CA 2184202 A EP 0751993 A JP 10501683 T	13-10-95 28-09-95 08-01-97 17-02-98
WO 9613596 A	09-05-96	FR 2726285 A AU 3847795 A EP 0787199 A FI 971783 A NO 971764 A ZA 9509086 A	03-05-96 23-05-96 06-08-97 25-04-97 17-04-97 16-07-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.